

Quorum Sensing と菌体増殖

池田 宰

微生物間情報伝達機構の一つである「Quorum Sensing」については、その存在の発見からすでに40年ほどが経過し、研究の進展とともに、さまざまな知見が得られてきている。特に、細菌による感染、病原性発現やバイオフィーム形成との関連について、その多くがQuorum Sensing制御下にあることが報告されている。ところで、いわゆる「細胞間シグナル伝達」「細胞内シグナル伝達」などの研究は、多細胞系の高等生物などにおいても広く行われてきており、これらとQuorum Sensingはどのように異なり、区別されているのか、曖昧な認識の方々が多いのではないと思われる。また、Quorum Sensingが細菌密度依存的な遺伝子発現制御ということから、Quorum Sensingの制御により菌体増殖を制御したいというご相談を受けることも多い。本稿では、知られてきているようで、しかし、正確には理解されていないと思われる「Quorum Sensingとは何か」について、これまでに明らかにされてきた内容とともに解説したい。

Quorum Sensing とは

名前の由来 海洋性発光細菌 *Vibrio fischeri* の菌体発光と菌体増殖数の関係に気付き、Quorum Sensing機構を最初に発見したのは、J. W. Hastingsであるが、この機構のことを「Quorum Sensing」と名付けたのは、E. P. Greenbergである。「quorum」とは、議決に必要な「定足数」を意味する法律用語である。微生物の挙動に対してこの畑違いの言葉を用いた理由として、Greenbergは「弁護士である自分のいところに自分の最新の研究内容を説明するため、相手にとって理解可能な用語を考えたからである」と記している¹⁾。今でこそ、英語の辞書にも載っているほど市民権を得ているQuorum Sensingという言葉であるが、新規な事象について市民権を得るためには、内容に対する興味とともに受け入れやすい名称をつけることが、科学の世界といえども重要であるという例ではないだろうか。一方、オートインデューサーとも呼ばれるQuorum Sensingにおけるシグナル物質については、ホルモン様であるところから「quormon」と呼称しようという動きもあったが、こちらの方は、今までの

ところ、それほど浸透はしていないようである。ところで、「quorum」の発音（日本語表記）であるが、生物系の雑誌では、「クオラム」と書かれることが多い。発音記号は「kwó:rəm」であり、「wall (wó:l):ウォール」のように「クォーラム」と書くべきではないかと筆者は思っている。ちなみに、JST科学技術用語日英対訳辞書では「quorum:クォーラム」とカタカナ表記がなされている。

機構の基本 さて、Quorum Sensing機構についてあらためて紹介したい。細菌は、Quorum Sensingで利用するシグナル物質を菌体内で自ら生産する。その後、シグナル物質は菌体外に放出され、菌体の増殖、集合などに伴い、その濃度が増加する。シグナル物質の濃度増加は、菌体内、または、菌体表面に存在するレセプターに認識され、その結果、特定の遺伝子の転写活性が制御される。グラム陰性細菌のレセプターは菌体内に存在し、グラム陽性細菌のレセプターは菌体表面に存在している。

Quorum Sensingに用いられるシグナル物質は、属、種によってその構造が異なっている。多くのグラム陰性細菌においては共通してアシル化ホモセリンラクトン(AHL)類が、グラム陽性細菌ではペプチドが、放線菌ではA-ファクターなどが著名であるが、それ以外にも、AI-2をはじめ、図1に示すような化合物がシグナル物質として報告されている²⁾。また、近年、AHLのアシル鎖部分の構造の多様性が報告されてきており³⁾、今後、より多くのシグナル物質の存在が明らかになる可能性が示されている。

シグナル物質の探索 シグナル物質の詳細な構造解析には、MS、NMRなどの機器分析が必須であるが、培養液中のシグナル物質の濃度は通常 μM レベル以下であるため、通常の機器分析に用いるためにはかなりの濃縮が必須となる。そこで、シグナル物質の探索には、感度の高いバイオペポーターを用いる手法が一般的となっている。通常、自らが生産するシグナル物質にのみ応答することが一般的であるが、特に、シグナル物質としてAHLを用いているグラム陰性細菌のQuorum Sensingにおいては、自らが生産するAHL以外の広範囲の構造のAHLに対して応答する細菌が存在する。このような

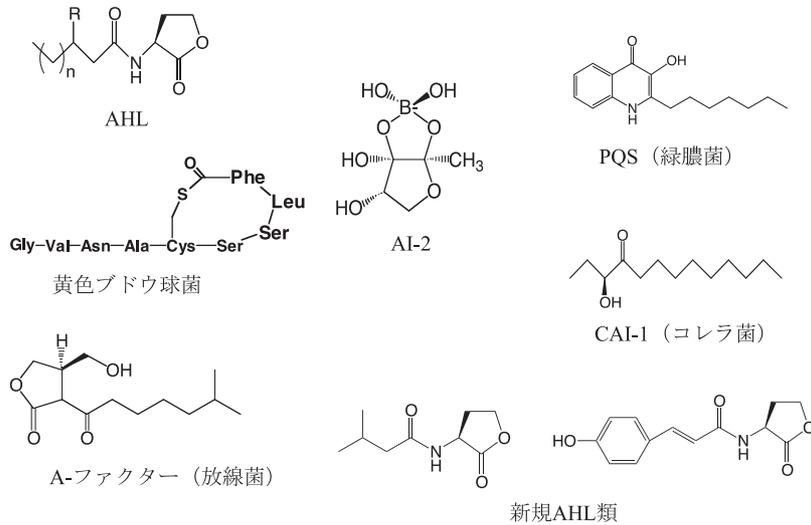


図1. さまざまな細菌が用いているシグナル物質の例

細菌は、生態学的には、他種属の生産するAHLにも応答し、自らの生存に有利なような対応をしているものと考えられているが、このように広範囲のAHLに応答する菌株が、シグナル物質検知のレポーター株として有用である。*Chromobacterium violaceum*は、Quorum Sensingにより、紫色色素 (violacein) の生産を制御しているが、菌株により応答するAHLの構造が異なっている。*C. violaceum* ATCC 31532株は短鎖 (C4~C8) のAHLに応答する。一方、*C. violaceum* ATCC 12472株は長鎖のAHL (C8~C14) に応答するという、正反対の応答を示す^{4,5)}。*C. violaceum*のAHL合成遺伝子破壊株は、外部から添加されたさまざまなAHLに対して応答し、violaceinを生産するため、視覚的に容易にAHLの検出が可能であることから、AHL検出のレポーター株として用いられている。*C. violaceum* ATCC 31532株のAHL合成遺伝子破壊株であるCV026株は著名であるが、前述の通り、基本的には短鎖のAHLのレポーター株として有用である。そこで、筆者のグループでは、*C. violaceum* ATCC 12472株のAHL合成遺伝子破壊株であるVIR07株を長鎖のAHLのレポーター株として開発した^{4,5)}。これらCV026株とVIR07株という2種類のレポーター株を用いることにより、広範囲のAHLの網羅的なスクリーニングが可能となっている。

なお、新規なシグナル物質の探索には、シグナル物質合成酵素などをコードしているQuorum Sensing関連遺伝子の相同性検索を行うことも有効である。

Quorum Sensingと菌体増殖の関連

Quorum Sensing活性と増殖曲線 Quorum Sensingは前述のような機構であることから、Quorum Sensing制御下の活性は、図2-aに示すように、対数増殖期後期から立ち上がることが特徴の一つである。逆に、対象となる活性と菌体増殖との関連を見れば、その活性がQuorum Sensing制御下にあるかどうかの一つの手掛かりとなる。一方、対象菌体の培養上清を用意し、培養初期段階の培養液に添加することにより、その細菌がQuorum Sensing機構を有しているかどうかを見積もることも可能である。図2-bに示すように、始めから培養上清を添加していた場合、対象となる活性の上昇が増殖初期の早い時期から観察される、すなわち、活性の立ち上がりが早い時期に移動することが観察されれば、この

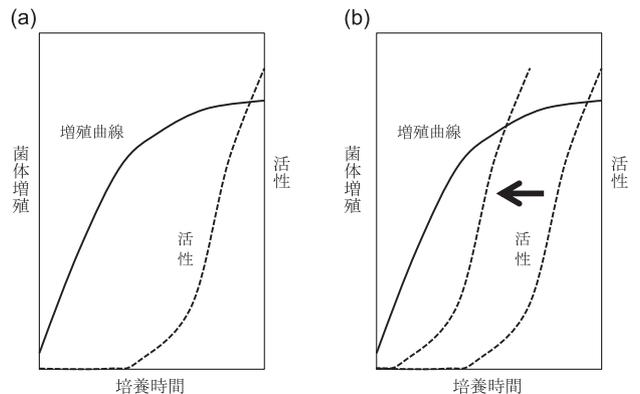


図2. 菌体増殖とQuorum Sensing活性の相関

細菌がQuorum Sensing機構を有し、培養上清にそのシグナル物質が含まれている可能性が高くなる。

さて、この場合、重要なポイントは、あくまでも変化があるのは活性の立ち上がり時期のみであり、菌体増殖曲線には影響を与えない、という点である。すなわち、最終到達菌体濃度にも影響を与えない。Quorum Sensingは、あくまでも、「増殖には関連のない細菌の特定の機能の発現制御に関わっている」ものであり、Quorum Sensingにより菌体増殖量を制御する、ということとはできない。もちろん、シグナル物質として有機物を分泌することから、複合共生係における周囲の他の属、種の菌体の増殖にシグナル物質が影響を及ぼす可能性はある。また、Quorum Sensingを利用する細菌の中には、自らのシグナル物質を分解する酵素を有しているものもあり、シグナル物質を資化していることも考えられている。しかしながら、自らが使用するシグナル物質が自らの増殖を直接制御することではなく、Quorum Sensingと菌体増殖は関係がないということが原則である。

Quorum Sensing制御方法 Quorum Sensingが細菌の種々の機能の制御に関わっているところから、その制御方法に関する研究が多数行なわれている。Quorum Sensingを制御するためには、その作用機構に従い、種々の方法とその成果が報告されている^{2,3)}。

シグナル物質の合成酵素、または、レセプターをコードする遺伝子を欠損させれば、当然Quorum Sensingは機能しなくなる。合成酵素遺伝子のみの破壊株は、外部から加えられたシグナル物質に対して応答するため、特に、Quorum Sensingにより制御されている機能の解析には非常に有効となる。また、前述の通りのレポーター株としての利用に有用となる。

前述の*C. violaceum* ATCC 31532株においては、長鎖のAHLがviolaceinの生産を抑制し、*C. violaceum* ATCC 12472株においては、短鎖のAHLがviolaceinの生産を抑制する。すなわち、AHLがQuorum Sensingの阻害剤として機能しており、非常に面白い事例である^{4,5)}。このようなシグナル物質そのものが阻害剤として働くことは稀であるが、シグナル物質の構造類似体の開発は、積極的に行なわれている。グラム陽性細菌のQuorum Sensingにおけるシグナル物質であるペプチドのアナログとしては、図3-aに示すペプチドが黄色ブドウ球菌の病原性発現に関わるQuorum Sensingのシグナルペプチド(図1)の阻害剤として合成されている^{2,3)}。グラム陰性細菌のQuorum Sensingに対しては、海藻が生産する天然物(図3-b)⁶⁾や、化学合成により種々の化合物が報告されている(図3-c)³⁾。このような阻害剤は、対応するQuorum Sensing制御下の特定の活性にのみ作用し、繰り返しになるが、菌体増殖に対しては何ら影響を及ぼさない。なお、AHLはl体であるが、その光学異性体であるd体はシグナル物質としての活性はまったく示さず、また、阻害剤としても働かず、AHLレセプターの認識部位は、d体を一切認識しないということが推察される⁷⁾。

自然界では、非常にさまざまなQuorum Sensingシグナルのせめぎ合いが行なわれていることが明らかになってきている。たとえば、多種多様な試料からAHLを用いたQuorum Sensingを行っている多くの細菌がスクリーニングされてきている一方で、AHL分解能を有する細菌も多く得られている。AHLを利用する細菌とAHLを分解する細菌が環境中でどのような関係を構築しているかに関する解析はまだ明らかになってはいないが、

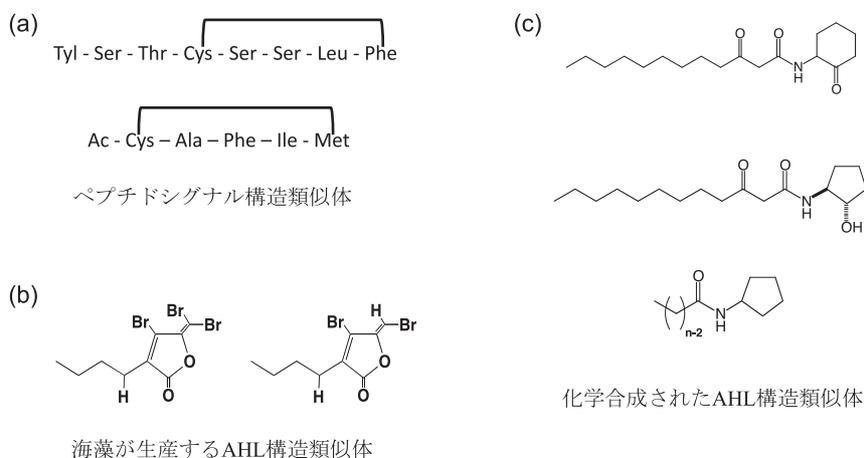


図3. Quorum Sensing 阻害活性を示すシグナル物質構造類似体の例

それぞれの生存戦略上の意義があるものと推察される。AHL分解細菌からは、AHLのアミド結合部位を切断するAHLアシラーゼとAHLのラクトン環部分を開裂するAHLラクトナーゼが種々取得されており、その発現遺伝子を植物に組み込むことによる植物病原菌に対する耐性獲得⁸⁾などの利用が図られているが、酵素そのものを固定化するなどの利用技術の開発も進められている。シグナル物質分解酵素はAHL以外のシグナル物質に対しても報告されている^{9,10)}。もちろん、これらシグナル物質分解酵素はAHLの濃度低減にのみ作用し、菌体の増殖に対する影響は示さない。

AHLの濃度を低減させる技術としては、AHLとコンプレックスを形成するような宿主化合物、トラップ剤などを用いる手法の開発も進んでいるが^{11,12)}、AHL分解細菌を直接用いる手法の開発も進められている¹³⁾。AHLを用いたQuorum Sensingにより病原性を発現する植物病原菌に対して、AHL分解能を有する対象植物由来の常在菌を優占種として用いることができれば、病原性の発現を抑えることが可能となることが期待される。

Quorum Sensing制御の有用性 これまで述べてきた通り、Quorum Sensingを抑制しても、菌体増殖は抑制できない。したがって、病原性の発現が抑制できても、病原性細菌の除菌、滅菌、殺菌はできない。このことから、Quorum Sensing制御の有効性に対する疑問が出てくることがある。しかし、病原性細菌に関して、現在、もっとも大きな問題となっているのは、抗生物質耐性菌の増加である。人間に対する医療の世界だけでなく、植物病原菌、魚病細菌などに対しても、多くの薬剤が使われている現状においては、さまざまな薬剤耐性菌の出現が起きている。Quorum Sensing制御において、化学物質（薬剤）を用いたとしても、その効果は菌体増殖に影響を与えないことから、耐性化が起こることは少ないと考えられ、この点においてはQuorum Sensing制御の有効性が期待されている。

もちろん、Quorum Sensing制御のみですべてが解決するわけではない。たとえば、細菌によるバイオフィーム形成において、Quorum Sensingは、細菌が分泌しバイオフィーム形成に重要な役割をはたしている細胞外多糖類（EPS）生産の制御など、バイオフィームの立体構造体形成に関与しているが、材料表面への初期吸着などには関与していないため、Quorum Sensing制御のみで細菌の付着をすべて防ぐことは難しい。しかし、

Quorum Sensingを制御することにより、EPS生産が抑制され、バイオフィームの立体構造体形成を抑えられれば、悪影響を抑制でき、浄化、洗浄なども簡便になることが期待される。既存の手法と組み合わせることにより、より有効な活用が期待される。

なお、Quorum Sensingの「制御」は、「抑制」のみに限定されるものではない。たとえば、活性汚泥中の硝化細菌による硝化能がAHLを添加することにより活性化されることが報告されている¹⁴⁾。すなわち、Quorum Sensingをポジティブに制御することによる活用も、今後進められていくものと期待されている。

おわりに

Quorum Sensingとその制御について、主に菌体増殖との関連を軸に解説してきた。多くの環境中でQuorum Sensingの存在が明らかとなってきており、その応答も、同一種、属の内部に限らず、広範囲の応答、そして、シグナル物質がおよぼす多種への影響など、新たな発見とともに広がりを見せている。Quorum Sensingの制御技術についてもさまざまな手法が開発され、その実用化が進められている。今後の展開が期待される。

文 献

- 1) Greenberg, E. P.: *ASM news*, **63**, 371 (1997).
- 2) Horinouchi, S. et al.: *Comprehensive Natural Products II: Chemistry and Biology*, **4**, 283 (2010).
- 3) Special issue: *Chemical Reviews*, **111**, 1 (2011).
- 4) Morohoshi, T. et al.: *FEMS Microbiol. Lett.*, **279**, 124 (2008).
- 5) Morohoshi, T. et al.: *Biosci. Biotech. Biochem.*, **74**, 2116 (2010).
- 6) Manefield, M. et al.: *FEMS Microbiol. Lett.*, **205**, 131 (2001).
- 7) Ikeda, T. et al.: *Chem. Lett.*, **30**, 314 (2001).
- 8) Dong, Y.-H. et al.: *Nature*, **411**, 813 (2001).
- 9) Shinohara, M. et al.: *J. Appl. Microbiol.*, **103**, 152 (2007).
- 10) Pustelny, C. et al.: *Chem. Biol.*, **16**, 1259 (2009).
- 11) Ikeda, T. et al.: *J. Incl. Phenom. Macro. Chem.*, **44**, 381 (2002).
- 12) Kato, N. et al.: *J. Incl. Phenom. Macro. Chem.*, **57**, 419 (2007).
- 13) Morohoshi, T. et al.: *Biosci. Biotech. Biochem.*, **73**, 2124 (2009).
- 14) 小林祐子ら：環境バイオテクノロジー学会誌，**9**，109 (2009).